ПАРАЗИТОЛОГИЯ, VIII, 3, 1974

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 576.893.19

О МЕТОДИКАХ РАБОТЫ С МИКРОСПОРИДИЯМИ

В. И. Воронин и И. В. Исси

Государственный научно-исследовательский институт озерного
и речного рыбного хозяйства и Всесоюзный научно-исследовательский
институт защиты растений, Ленинград

В статье приводятся основные методики, используемые при работе с микроспоридиями в полевых и лабораторных условиях.

Простейшие отряда *Microsporidia*, имея практическое значение, привлекают все больше внимание исследователей. Однако изучение микроспоридий (вследствие их чрезвычайно мелких размеров и сложности жизненных циклов) весьма затруднено. Дополнительным препятствием в работе с этими простейшими является необходимость применения нескольких разных методов исследования. Дело в том, что размер и форма живых спор микроспоридий являются основными диагностическими признаками, которые, однако, существенно изменяются в фиксирующих жидкостях. Исследование же только фиксированного материала не дает полного представления об изучаемом объекте; поэтому для полноценного изучения микроспоридий необходимо проводить исследования как живого, так и фиксированного материала.

Работа с микроспоридиями складывается из сбора материала в природе и изучения его в лаборатории. Обработка этих простейших в полевых условиях заключается в приготовлении водных препаратов и мазков и в фиксации для последующего гистологического исследования. Водные препараты служат для сохранения живых спор паразита в течение длительного времени, пока не предоставится возможность провести их изучение в лабораторных условиях. Изготовляются такие препараты следующим образом. Достаточно крупную каплю водной или приготовленной на физиологическом растворе суспензии спор помещают на предметное и осторожно накрывают покровным стеклом. После испарения излишков воды, но до появления пузырьков воздуха, края покровного стекла обводят расплавленным глицерин-желатином, приготовленным по обычной прописи. Хранятся такие препараты от нескольких месяцев до года и более в зависимости от качества глицерин-желатина и тщательности заделки. Следующий этап в работе со свежим метериалом — приготовление мазков. Мазки необходимы для изучения стадий жизненного цикла и определения рода и вида микроспоридий. После подсыхания крупных капель еще влажные (как бы запотевшие) мазки фиксируют одну-две минуты в абсолютном метаноле. Окрашивание производят по Романовскому-Гимза. Чем быстрее после фиксации мазки будут окрашены, тем качественнее они получатся; поэтому окрашивание мазков желательно проводить в полевых условиях. Для этого необходимо иметь готовый раствор азур-эозина и небольшое количество дистиллированной воды. Хорошие разультаты дают слабые растворы красителя — 0.5 или 2 мл азур-эозина на 100 мл дистиллированной воды. В первом случае окрашивание длится 12 и более часов, во втором —около 2 часов. При плохом качестве мазков, а также в том случае, если они при длительном хранении обесцветились, их можно перекрашивать снова. Для этого мазки помещают в 70° подкисленный соляной кислотой спирт, затем промывают в проточной воде и окрашивают вновь то той же методике. Влажные мазки можно также фиксировать в жидкости Буэна и хранить в 70° спирте до тех пор, пока не представится возможность окрасить их железным гематоксилином по Гейденгайну.

Для изучения локализации паразита и патологических процессов в клетках и тканях хозяина необходимо приготовление гистологических препаратов. Наиболее приемлема фиксация материала по Буэну в течение 1—2 суток, после которой его переносят для длительного хранения в 70° спирт. Также допустима фиксация в 4% растворе формалина. При изготовлении мазков и фиксации материала необходимо помнить, что для этих целей используются главным образом живые зараженные животные. В погибших от заражения особях стадии развития микроспоридий разрушаются и неизмененными остаются только споры.

При работе с микроспоридиями водных животных желательно приготовление тушевых препаратов. Они необходимы для выявления слизистых капсул, окружающих споры или панспоробласты некоторых видов микроспоридий при попадании их в воду. Наличие слизистых капсул рассматривается Ломом и Ваврой (Lom a. Vavra, 1961, 1963) как видовой признак у этих простейших. Изготовление тушевых препаратов в полевых условиях не представляют особого труда. На предметное стекло наносят небольшую каплю водной суспензии спор, а рядом в ней — такую же каплю черной туши, перемешивают их и накрывают покровным стеклом. Через 1—2 часа препарат можно изучать. Слизистые капсулы видны как светлый ареол вокруг спор или группы спор. Тушь оказывает фиксирующее действие и препарат сохраняется длительное время. При наличии достаточно большого количества материала часть его можно поместить во флакончик с обычной водой или физиологическим раствором. Таким образом, удается достаточно долго сохранить живые споры микроспоридий, несмотря на развивающиеся при этом процессы гниения.

Работа с микроспоридиями в лабораторных условиях заключается в изучении живых спор паразита (по водным препаратам или по материалу, сохраненному в воде) мазков и гистологических срезов. Живые споры паразита измеряют (не менее 25 экз.) и зарисовывают. Если есть возможность, споры фотографируют. Достаточно четкая фотография позволяет избежать субъективизма при зарисовке спор и надолго сохранить облик живых спор. Лом и Вайзер (Lom a. Weiser, 1969) разработали способ фотографирования спор микроспоридий. На тонкий слой 1.5% агар-агара, нанесенного предварительно на предметное стекло, помещается маленькая капля водной суспензии спор, которая накрывается покровным стеклом. В целях предотвращения высыхания препарата края покровного стекла обмазывают расплавленным парафином. Споры микроспоридий приклеиваются к агар-агару, чем устраняется броуновское движение, которое является серьезным препятствием при фотографировании. Наш опыт показывает, что при фотографировании спор весьма удобны также и водные препараты, о приготовлении которых говорилось в начале статьи. Способ приготовления их намного проще, а срок хранения — более продолжительный. Броуновское движение спор прекращается через 5—10 дней после приготовления препаратов.

Гистологическая обработка фиксированного материала состоит в изготовлении парафиновых срезов толщиною 5—6 мк. Их окрашивают железным гематоксилином по Гейденгайну или азур-эозином по Романовскому-Гимза. В первом случае хорошо видны патологические изменения и стадии паразита, во втором —четко выделяются скопления спор, красящихся в чистые, ярко-голубые тона.

Строение полярной нити и ее длина — важные систематические признаки. Чтобы вызвать выброс нити, на живые споры действуют слабыми растворами различных веществ. Наилучшие результаты получены при использовании 5—10% перекиси водорода или дистиллированной воды. Хорошие результаты дает механическое давление на препарат. Нити микроспоридий очень тонкие, малозаметные в проходящем свете и в нефиксированных препаратах споры исчезают; поэтому многие авторы рекомендуют приготовление постоянных препаратов серебрением по Фонтана. Наш опыт показывает, что необязательно прибегать к импрегнации нитей серебром, так как споры большинства видов семейства *Nosematidae* выбрасывают в тушевых и водных препаратах самопроизвольно. В пузырьках воздуха этих препаратов нити настолько контрастны, что легко могут быть измерены. Кроме того, выброшенные нити хорошо видны в темном поле и при фазово-контрастной микроскопии.

Важным моментом в работе с микроспоридиями является коллекционирование материала. Наличие коллекции намного облегчает определение и дифференциацию видов, особенно имеющих споры, близкие по форме и размеру. Коллекционируют мазки, гистологические срезы и водные препараты. В настоящее время коллекция, насчитывающая более 100 видов микроспоридий, создана в Лаборатории микробиометода Всесоюзного научно-исследовательского института защиты растений.

Литература

Lom J. and J. Weiser 1969. Notes on two microsporidian species from Siluris glanis and on the systematic status of the genus Glugea Thelohan. Folia parasitol., 16 : 193—200.

Lom J. and J. Vavra. 1961. Mucous envelopes as a taxonomic character in Cnidosporidian spores. J. Protozool., 8 (Suppl.) : 18.

Lom J. and J. Vavra. 1963. Mucous envelopes of spores of the subphylum Cnidospora (Doflein, 1901). Vest. Cs. spol. zool., 27 : 4—6.

ON THE METHODS OF WORK WITH MICROSPORIDIANS

V. N. Voronin and I. V. Issi

SUMMARY

Extremely small sizes and the complexity of the life cycles of microsporidians require individual methods of work with these Protozoa.

The paper describes the main techniques used in the woork with microsporidians under field and laboratory conditions.